



TITLE:

泌尿器腫瘍と酵素 5.酢酸鉛による実験的腫瘍におけるLactic Dehydrogenase,Alkaline Phosphatase,Leucine Aminopeptidase,Total Acid Phosphatase活性およびLDH isozymesの変動について

AUTHOR(S):

石部, 知行

CITATION:

石部, 知行. 泌尿器腫瘍と酵素 5.酢酸鉛による実験的腫瘍におけるLactic Dehydrogenase,Alkaline Phosphatase,Leucine Aminopeptidase,Total Acid Phosphatase活性およびLDH isozymesの変動について. 泌尿器科紀要 1968, 14(6): 313-318

ISSUE DATE:

1968-06

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/119874>

RIGHT:

泌 尿 器 腫 瘍 と 酵 素

V 酢酸鉛による実験的腫瘍における Lactic Dehydrogenase,
Alkaline Phosphatase, Leucine Aminopeptidase, Total Acid
Phosphatase 活性および LDH isozymes の変動について

広島大学医学部泌尿器科学教室（主任：仁平寛巳教授，指導：加藤篤二前教授*）

石 部 知 行

UROLOGICAL NEOPLASMS AND ENZYMES

V. STUDIES ON THE ALTERATION OF LACTIC DEHYDROGENASE,
ALKALINE PHOSPHATASE, LEUCINE AMINOPEPTIDASE, TOTAL
ACID PHOSPHATASE ACTIVITIES AND LDH ISOZYMES IN
EXPERIMENTALLY INDUCED RENAL TUMORS
WITH LEAD ACETATE

Tomoyuki ISHIBE

*From the Department of Urology, Hiroshima University School of Medicine**(Chairman: Prof. H. Nihira, M. D.)**(Instructed by the Former Prof. T. Katō, M. D.)*

From the purpose of inducing renal tumors Wistar strain rats were fed on CE-2 powder food supplied by "Nihon Clea" containing 10 % of lead acetate.

Renal and serum activities of lactic dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (AℓP), leucine aminopeptidase (LAP) and total acid phosphatase (TAP) and LDH isozymes were determined for the subsequent 12 months period. The results are summarized as follows.

1. No significant difference on LDH activities in serum and the kidney tissue was demonstrated between experimental group and controls.

2. LDH isozyme pattern of the kidney tissue showed higher values of M type and the fraction III and lower value of H type in the experimental group than that in the controls. In the serum, however, the experimental group showed lower M type and the fraction III and slightly higher H type than that in the controls.

3. AℓP activity of the kidney tissue was definitely lower in the experimental group than in the controls.

Serum AℓP activity was also slightly lower in the experimental group than controls.

4. LAP activity of the kidney tissue in the experimental group definitely showed a decrease in accordance with the extension of the experimental period. However, no significant difference of serum LAP activity was demonstrated between the experimental group and controls.

5. A slightly high TAP activity was found in the kidney tissue of the experimental group, but no difference in the serum was demonstrated between the two groups on TAP activity.

* 現京都大学教授

鉛化合物による腎腫瘍の発生は Zollinger が硫酸鉛の注射による腫瘍発生を報告したのにはじまり、Van Esch は1%の酢酸鉛を2年間にわたり経口投与することによって腎に悪性腫瘍を作り得ることを明らかにした。このほか dimethylnitrosamine, 女性ホルモン, methylcholanthrene, thorotrast などによって腎に腫瘍ができることが知られている。

著者は前報において DMNA によるラット腎腫瘍の発生にあたってみられる腎および血清の酵素活性の変動を追求した。今回はラットを用い酢酸鉛による腎腫瘍の発生を試み、12カ月間にわたり経時的に腎および血清について2, 3の酵素活性の変動を追求したのでこの結果を報告する。

実 験 法

100g前後の雄 Wistar 系ラットに対し、Boyland (1962) の方法にしたがって10%の割合で酢酸鉛(和光純薬, 特級)を日本 Clea 社製 CE-2 固形飼料(粉末化)に含むものを経口投与し、以後12カ月間にわたり経時的に断頭、瀉血し腎をとり出しその皮質を実験に供した。血清および腎皮質組織内酵素活性の測定には3匹の平均をとった。酵素活性の測定はいずれも試料作製後24時間以内に処理するようにした。動物は水および飼料は自由に摂取させ、比較的恒温恒湿下に飼育した。

酵素活性の測定法および単位は前報と同様の方法に従った。

成 績

I Lactic Dehydrogenase (LDH)

A) 組織

対照群の LDH 活性は $3.16 \sim 5.06 \times 10^5$ WU の間にあり、わずかではあるが加令に伴って活性の増加がみられ、その平均は 4.15×10^5 WU であった。酢酸鉛投与群でも同様の傾向を認め、 $3.71 \sim 5.81 \times 10^5$ WU にありその平均は 4.50×10^5 WU で、両群の間に明らかな差を認めなかった。

B) 血清

対照は $3.6 \sim 8.1 \times 10^2$ WU に分布しその平均は 5.9×10^2 WU を示し、加令に伴う変化はほとんどみられなかった。一方酢酸鉛投与に伴う変動も同様で $4.5 \sim 9.7 \times 10^2$ WU にあり、その平均は 6.6×10^2 WU とやや対照に比し高いが有意ではない。

II LDH isozymes

前編と同様H型とM型に分けてこれを検討した。

A) 組織

M型は対照群では9.3~14.8%にあり加令に伴う変化は11カ月以後増加するものもあったが、平均は10.9%でほとんど変化しないといえる成績であった。他方酢酸鉛の投与を行なうと14.9~24.5%に分布し実験初期よりその占める割合は高く、平均でも21.8%と対照に比しかなり高い割合を示した。H型は対照は61.0~68.7%に分布して加令によりやや減少する傾向を認め、その平均は64.3%であった。これに対し酢酸鉛投与群では逆に実験初期よりその占める割合が低く、その平均は56.1%と明らかに対照より低い割合を示した。第Ⅲ分画については対照は21.7~29.3%にあり、平均24.8%であったのに対し、実験群では18.0~30.6%にありその平均は22.1%と対照に比しやや高い割合を示したが、実験経過に伴う増減は明らかではなかった。

B) 血清

対照のM型は85.4~89.6%にあり、その平均は87.1%で加令に伴う変動は見られなかった。酢酸鉛投与群では81.3~86.9%に分布し、その平均は84.1%と対照に比しやや低い割合を占めた。一方H型は対照は6.9~8.9%にあり、その平均は7.9%、加令に伴う変化はみられなかった。酢酸鉛投与群では10.0~15.1%にあり、その平均は11.8%と対照に比しやや高い割合を占めた。第Ⅲ分画は対照は3.8~7.7%とばらつきが大きいとその平均は5.0%で、加令に伴いやや増加する傾向を認めた。一方実験群では2.9~5.7%にあり、その平均は4.1%と対照に比し低い割合を示した。

III Alkaline Phosphatase (ALP)

A) 組織

対照は $2.07 \sim 4.13 \times 10^3$ KAU にあり、その平均は3.06 KAU で加令による活性の増大がみられた。これに対し酢酸鉛投与群では $1.15 \sim 2.58 \times 10^3$ KAU を示し、平均 1.18×10^3 KAU と対照に比し明らかに活性の低下がみられた。

B) 血清

対照は $1.9 \sim 6.4$ KAU にありその平均は4.7 KAU を示したが、加令に伴う変化は明らかではなかった。酢酸鉛投与群では $1.3 \sim 7.8$ KAU とばらつきが大となったが、その平均は4.4 KAU と対照に比しやや低い活性を示した。

IV Leucine Aminopeptidase (LAP)

A) 組織

対照は $7.62 \sim 13.14 \times 10^3$ GRU に分布し、その平均

Table 1. Enzyme activities of the kidney along with development.

Treatment Months	LDH, total $\times 10^5$ WU	LDH-M %	LDH-III %	LDH-H %	ALP $\times 10^3$ KAU	LAP $\times 10^3$ GRU	TAP $\times 10^3$ KAU
1	3.24	9.9	22.5	67.6	2.38	7.62	1.19
2	3.16	9.5	24.0	66.5	2.19	7.83	1.10
3	3.21	9.6	21.7	68.7	2.07	7.65	1.44
4	3.52	9.4	22.8	67.8	2.15	8.34	1.49
5	3.88	11.0	27.2	61.8	2.15	9.34	1.45
6	3.97	9.8	23.9	66.3	2.96	9.19	1.48
7	4.41	10.7	26.8	62.5	3.33	9.90	1.63
8	4.63	9.6	28.8	61.6	3.46	12.28	1.62
9	4.75	9.3	29.3	61.4	3.75	12.60	1.35
10	5.06	13.3	25.7	61.0	4.13	12.27	1.38
11	4.97	14.4	21.9	63.7	4.12	13.14	1.09
12	5.04	14.8	23.4	61.8	4.0	13.05	1.34
Means	4.15	10.9	24.8	64.3	3.06	10.27	1.38

Table 2. Enzyme activities of the serum along with development.

Treatment Months	LDH, total $\times 10^2$ WU	LDH-M %	LDH-III %	LDH-H %	ALP KAU	LAP $\times 10^2$ GRU	TAP KAU
1	5.3	87.5	3.8	8.7	5.1	1.9	14.1
2	8.1	87.2	4.5	8.3	4.0	1.6	11.7
3	5.9	87.8	4.4	7.8	4.9	1.3	9.7
4	4.7	86.6	4.5	8.9	4.6	1.6	10.7
5	5.1	86.4	4.7	8.9	5.7	1.7	11.9
6	3.6	89.6	3.5	6.9	4.3	1.9	12.3
7	5.9	88.2	4.1	7.7	4.8	2.5	12.0
8	5.2	85.4	7.7	6.9	6.4	2.9	8.8
9	4.9	88.4	4.0	7.6	3.1	2.8	9.6
10	7.9	87.4	4.3	8.3	1.9	2.5	10.2
11	7.4	85.5	6.9	7.6	6.2	2.9	11.0
12	6.3	85.5	6.8	7.7	5.7	2.5	11.0
Means	5.9	87.1	5.0	7.9	4.7	2.2	11.1

Table 3. Enzyme activities of the kidney during lead acetate carcinogenesis.

Treatment Months	LDH, total $\times 10^5$ WU	LDH-M %	LDH-III %	LDH-H %	ALP $\times 10^3$ KAU	LAP $\times 10^3$ GRU	TAP $\times 10^3$ KAU
1	3.72	14.9	30.6	54.5	2.55	8.47	0.84
2	3.71	20.7	25.2	54.1	1.49	7.02	1.25
3	3.89	19.6	23.6	56.8	1.34	6.77	1.12
4	4.15	21.4	21.4	57.2	1.29	6.68	1.09
5	4.63	23.8	18.0	58.2	1.15	5.60	1.12
6	4.30	24.5	21.8	53.7	1.52	6.06	1.14
7	3.98	22.7	19.3	58.0	1.80	6.69	1.34
8	4.25	23.6	18.8	57.6	2.11	6.63	1.46
9	5.81	23.1	19.5	57.4	2.07	6.46	1.16
10	4.74	21.6	24.5	53.9	2.39	6.10	1.16
11	5.26	23.5	21.2	55.3	2.58	7.08	0.94
12	5.46	24.0	21.2	54.8	2.23	5.37	1.16
Means	4.50	21.8	22.1	56.1	1.88	6.58	1.15

Table 4. Enzyme activities of the serum during lead acetate carcinogenesis.

Treatment Months	LDH, total $\times 10^2$ WU	LDH-M %	LDH-III %	LDH-H %	ALP KAU	LAP $\times 10^2$ GRU	TAP KAU
1	6.4	83.9	3.6	12.5	5.8	3.9	11.0
2	8.9	85.4	4.3	10.3	5.0	2.5	12.8
3	5.3	85.5	4.5	10.0	2.5	2.5	10.9
4	5.4	84.4	4.5	11.1	4.0	2.4	9.9
5	6.0	84.3	5.2	10.5	7.0	0.8	9.3
6	8.8	82.8	5.6	11.6	7.8	1.0	14.4
7	6.2	81.3	5.7	13.0	3.7	2.8	8.9
8	7.5	81.6	3.3	15.1	5.7	2.6	12.4
9	4.5	81.6	3.6	14.8	2.7	2.4	8.7
10	5.1	84.8	3.3	11.9	1.3	3.4	8.5
11	9.7	86.9	2.7	10.4	5.2	4.1	8.5
12	5.6	86.5	2.9	10.6	2.3	3.2	8.6
Means	6.6	84.1	4.1	11.8	4.4	2.6	10.3

は 10.27×10^3 GRU で加令に伴う活性の増大がみられる。実験群では $5.37 \sim 8.47 \times 10^3$ GRU を示し、その平均は 6.58×10^3 GRU で対照と逆にやや減少の傾向を示した。

B) 血清

対照は $1.3 \sim 2.9 \times 10^2$ GRU にありその平均は 2.2×10^2 GRU を示し、加令に伴う増加はわずかであった。酢酸鉛投与による変化は $0.8 \sim 4.1 \times 10^2$ GRU と広い範囲にわたっているが、その平均をとれば 2.6×10^2 GRU と対照と大差を認めなかった。

V Total Acid Phosphatase (TAP)

A) 組織

対照は $1.09 \sim 1.63$ KAU にあって加令に伴う増加は著明でなく、その平均は 1.38 KAU を示した。酢酸鉛投与群では $0.84 \sim 1.46$ KAU にあり、その平均は 1.15 KAU と対照よりやや高い活性を示した。

B) 血清

対照は $8.8 \sim 14.1$ KAU にあり、その平均は 11.1 KAU であった。これに対し酢酸鉛投与群では $8.5 \sim 14.4$ KAU にあり、変化が強いがその平均は 10.3 KAU と対照と大差を示さなかった。

考 按

Boyland など(1962)によると酢酸鉛は hemo-globin 代謝を障害し porphyrin の尿中排泄を増加させるが、この lead porphyrin が腎に対し直接発癌性に作用するものであろうとし、鉛自体の発癌性は骨に腫瘍ができないことからこれを否定した。彼は酢酸鉛を乾燥食に対し 1% W/W 含む飼料を与えることにより、11カ月目

に腎に腫瘍が初発し 320 日生存した 16 匹中 15 匹に人腎癌に似た腎腺腫ないし腺癌の見られたことを明らかにし、それ以前の変化としては cystic nephritis ないし degenerative change の像がみられるとした。また Van Esch によると酢酸鉛の投与により 1 カ月すると inclusion body の出現, cystic formation, 尿細管上皮の増殖などがみられ始め、この inclusion body は virus とは関係ないもので Landing などによると蛋白質よりなるものであるとし、また Bracken は Feulgen 反応が陽性であるとした。本実験の場合組織学的に検討した範囲内では尿細管の変性を主とする退行性変化はいずれの例にもみられたが、明らかな腫瘍の発生を認め得た例はなかった。しかしながら Boyland その他の報告にあるように酢酸鉛による腎腫瘍発生を前提とすれば、今回の実験は前癌状態での酵素活性の変化を追ったことになる。

以上のごとく酢酸鉛は dimethylnitrosamine と異なり腫瘍発生までの期間は長い、できる腫瘍形態が一樣であるという特長を有する。このような実験腎腫瘍について論じたものは、Murphy の dimethylnitrosamine 投与による実験的腎腫瘍の際見られる尿中酵素活性の変動を追求した論文があるのみで、酢酸鉛投与によるこのような報告はみられない。

LDH は解糖に関与する酵素の 1 つで、腎では集合管に比較的多く含まれる。その増加は悪

性腫瘍の速やかな増殖とその代謝の結果であると Douglas は述べ、Meister は実験腫瘍では LDH 活性の増加のあることを明らかにした。著者も dimethylnitrosamine 投与による実験的腎腫瘍、20-Methylcholanthrene による実験的前立腺癌などでこのことを明らかにした。またその解糖特性によって LDH を M 型と H 型に分けることができ、臓器の発育、特に機能およびその分化に伴ってこれが変動することが知られ、腎では皮質、髄質で異なった pattern を示すことも小林、Richerich、Fine、Jensen などにより報告されている。dimethylnitrosamine による実験腎腫瘍組織では、Starkweather、Pfeiderer などの述べるように M 型および第Ⅲ分画の増加が見られたのに対し、今回の成績は腎および血清の何れにおいても LDH 活性の変動は少なく、M、H 分布については腎組織でも M 型の増加、H 型の低下がみられ、血清では M 型の減少、H 型の増加がみられた。このような両者の動きの不一致は前の dimethylnitrosamine 投与による実験でもみられたところで、組織から血清への酵素の移行の少ないこと、血清での M 型の不活性化ないし Murphy などが述べるように尿中への排泄の増加などが考えられる。

phosphatase は核蛋白、含水炭素、磷脂質などの代謝に関係する酵素で、実験腫瘍における ALP 活性に関し森などは組織化学的に炎症を伴った上皮に多いとしているが、腎では LAP とともに比較的局在性があり、紅斑性狼瘡で腎の ALP の減少することを Pollak は報告している。血清中の酵素活性の変動が臓器診断に役立つものであると考えられるが、今回の実験では腎では明らかな低下を認めたが血清でのバラツキが大で一定した変化を示さなかった。このことは dimethylnitrosamine 投与による腎の態度と同様であるが、LDH と同様血清ではやや変化が遅れてみられるように考えられた。

LAP は近位尿細管に存在するという特異性からしてこの部の障害で尿中に増加するといわれ、尿による腎障害の診断に有用であるとされわが国では三矢などがこれについて報告している。Gomori は腎癌組織で陽性になるとし、

Burstone、Monis などは腫瘍細胞より周囲の結合織中に多く存在することを明らかにし、Glennner は悪性度の強い場合増加するとした。著者の成績では組織内 LAP は明らかに減少の傾向にあって dimethylnitrosamine のそれと同様であり、尿細管の腫瘍性増殖に伴う間質量の減少とも関係したものであろうと考えられる。血清については dimethylnitrosamine と異なり、対照と大差を示さなかった。

酸 phosphatase については Goniori、林などは前立腺癌でその活性が高いとし、Woodard、Hoare などは前立腺癌では正常より低いとしたように前立腺では注目され、前立腺癌の血清診断には広く用いられるところであるが、腎では局在性がなく腫瘍診断上の価値は少ないと考えられる。著者の場合もこれを反映し、特有の変化を血清、組織とも示さなかった。

以上の実験において酢酸鉛投与に基づく鉛の骨への沈着なども考えられ、これに基づく血清 ALP 活性の変動などもあると考えられるが、今回の実験では ALP isozymes による検討を行っていないのでこの点については今後の検討が必要であろう。しかし Boyland、Van Esch の実験によると乳腺腫瘍、腸間膜肉腫などの報告がみられるが、これらは18カ月以後の発生であったとした。このほか Tönz などが述べるように封入体がみられ、核の異常に基く尿細管上皮の核分裂障害といったことも酵素活性の面から検討されるべきで、今後組織化学的面の検討を行ないたいと考える。

結 語

腎腫瘍発生の目的で Wistar 系ラットに対し10%の割合に酢酸鉛を含む日本 Clea CE-2 粉末飼料を経口投与し、12カ月にわたり経時的に腎および血清の LDH、ALP、LAP、TAP 活性および LDH isozymes を検討し次の結果を得た。

1. LDH 活性は血清および腎組織のいずれにおいても実験群と対照群との間に明らかな差を認めなかった。

2. LDH isozymes パターンは、腎組織にお

いては対照に比し実験群でM型および第Ⅲ分画が高く、H型が低い割合を占めた。血清においては対照に比し実験群ではM型、第Ⅲ分画が低く、H型がやや高い割合を占めた。

3. ALP 活性は実験群の腎組織では対照群に比し明らかに低かった。血清でも同様対照群に比しやや低い活性を示した。

4. LAP は実験群では実験期間の延長に従って明らかに腎組織での活性の低下がみられたが、血清では対照と大差を示さなかった。

5. TAP は腎組織でやや高い活性を示したが、血清では対照との間に差を認めなかった。

(終るにあたり恩師加藤篤二前教授の御指導、仁平寛巳教授の御校閲を感謝致します。

本論文の要旨は1966年4月第54回日本泌尿器科学会総会におけるシンポジウムの一部である。)

文 献

- 1) Boyland, E., C. E. Dukes, P. L. Graver & B. C. V. Mitchley: Brit. J. Cancer, **16**: 283, 1962.
- 2) Bracken, E. C., D. L. Beaver & C. C. Randall: J. Path. Bact., **75**: 253, 1958.
- 3) Burstone, M. S.: J. Nat. Cancer Inst., **16**: 1149, 1956.
- 4) Douglas, W. R.: Brit. J. Cancer, **17**: 415, 1963.
- 5) Fine, I. H., N. O. Kaplan & D. Kuftinec: Biochemistry, **2**: 116, 1963.
- 6) Glenner, C. G., M. S. Burstone & D. B. Meyer: J. Nat. Cancer Inst., **23**: 857, 1959.
- 7) Gomori, G.: Arch. Path., **32**: 189, 1941.
- 8) Hoare, H., G. E. Delory, D. W. Penner: Cancer, **9**: 721, 1956.
- 9) Hayashi, M., K. Shimoda, K. Ogata, T. Takamori, T. Shiraogawa, S. Kuroki, M. Utida & O. Kawase: Kumamoto Med. J., **7**: 114, 1955.
- 10) Jensen, K. & E. B. Thorling: Acta Path. Microbiol. Scand., **63**: 385, 1965.
- 11) 小林快三・加藤克己・前田憲志・今井常喜: 日腎誌, **9**: 489, 1967.
- 12) Landing, B. H. & H. Nakai: Amer. J. Clin. Path., **31**: 499, 1959.
- 13) Meister, A.: J. Nat. Cancer Inst., **10**: 1263, 1950.
- 14) Monis, B., M. M. Nachlas & A. M. Seligman: Cancer, **12**: 1238, 1959.
- 15) Murphy, G. P., E. A. Mirand, G. S. Johnston, J. D. Schmidt & W. W. Scott: Invest. Urol., **4**: 39, 1966.
- 16) Pfeiderer, G. & E. D. Wachsmuth: Biochem. Z., **334**: 185, 1961.
- 17) Pollak, V. E., H. Mattenheimer, H. DeBruin & K. J. Weinman: J. Clin. Invest., **44**: 169, 1965.
- 18) Richterich, R., P. Schaferoth & H. E. Franz: Enzymol. Biol. Clin., **1**: 114, 1961-2.
- 19) Tönz, O.: Zschr. Ges. Exp. Med., **128**: 361, 1957.
- 20) Van Esch, G. J., H. Van Genederen & H. H. Vink: Brit. J. Cancer, **16**: 289, 1962.
- 21) Woodard, H. O.: Cancer, **5**: 236, 1952.
- 22) Zollinger, H. V.: Virchow's Arch., **323**: 694, 1953.

(1968年2月22日受付)